



COMUNICACIONES PÓSTER

19.^a Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión- Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial

Madrid, 26-28 de marzo de 2014

Investigación preclínica

1. LA DIABETES DE TIPO 1 INCREMENTA LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO NEURONAL Y DE ANIONES SUPERÓXIDO Y NO MODIFICA LOS NIVELES DE PEROXINITRITOS EN ARTERIA MESENTÉRICA DE RATA

E. Sastre¹, L. Caracuel¹, J. Blanco-Rivero¹, N. de las Heras², V. Lahera² y G. Balfagón¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid; Instituto de Investigación Sanitaria La Paz (IdIPaz), Madrid. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Introducción: La inervación nitrérgica es primordial en el control del flujo sanguíneo mesentérico. La diabetes induce complicaciones vasculares asociadas con un incremento en estrés oxidativo y síntesis de peroxinitritos. (ONOO[·]). Sin embargo, Joslin Medalist Study sugiere la existencia de factores protectores endógenos en diabetes de tipo 1. El objetivo de este trabajo fue analizar la posible modulación de la síntesis de ONOO[·] en diabetes.

Métodos: Se utilizaron segmentos de arteria mesentérica sin endotelio de ratas controles y diabéticas (inducción con estreptozocina, 55 mg/kg; 8 semanas). Se analizó el efecto de inhibidor no específico de la óxido nítrico sintasa (NOS) L-NAME (0,1 mM), y del inhibidor específico de la NOS inducible AMT (5 nM) sobre la respuesta vasoconstrictora inducida por estimulación eléctrica (EE), así como la respuesta vasodilatadora al donante de óxido nítrico (NO) DEA-NO. Se midió la liberación de NO en presencia o ausencia del inhibidor específico de la NOS neuronal 7-NI (0.1 mM). Los niveles de aniones superóxido (O₂[·]) y de ONOO[·] también fueron determinados.

Resultados: El L-NAME incrementó la vasoconstricción inducida por EE en ambos grupos experimentales, pero en mayor medida en segmentos de ratas diabéticas. La incubación con AMT no alteró la respuesta vasoconstrictora a EE. La vasodilatación inducida por DEA-NO fue similar en segmentos de ambos grupos experimentales. En ratas diabéticas las liberaciones de NO y de O₂[·] fueron incrementadas, mientras que la síntesis de ONOO[·] no se vio modificada.

La preincubación con 7-NI prácticamente abolió la liberación de NO inducida por EE.

Conclusiones: La aplicación de EE indujo la liberación de NO de origen neuronal de la inervación nitrérgica, a través de la NO sintasa neuronal. En ratas diabéticas de tipo 1 las liberaciones de NO y de O₂[·] fueron incrementadas, mientras que la síntesis de ONOO[·] no se vio modificada, indicando que la síntesis del tóxico ONOO[·] es limitada. Estos resultados sugieren que los que EE podrían estar implicados en otra ruta metabólica, limitando de esta manera la síntesis de ONOO[·], y por lo tanto contribuyendo al mantenimiento de la función de la inervación nitrérgica en diabetes.

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-10374), el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38530) y la Fundación Mapfre.

2. REGULACIÓN POR ANGIOTENSINA II DE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE ENZIMAS IMPLICADA EN LA SÍNTESIS DE PROSTANOIDEOS

A. Aguado Martínez¹, O. Zhenyukh¹, M.S. Avendaño Herrador¹, L. García Redondo¹, C. Rodríguez Sinoval², J. Martínez González², M.J. Alonso Gordo³, D. Dixon⁴, A.M. Briones Alonso¹ y M. Salaices Sánchez¹

¹Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital La Paz (IdiPAZ), Madrid. ²Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Barcelona. ³Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón. ⁴University of Kansas Medical Center, Kansas City.

Introducción: Angiotensina II (Ang II) e interleuquina 1 β (IL-1 β) están implicadas en patologías cardiovasculares a través de sus acciones proinflamatorias. Entre ellas, la inducción de enzimas como COX-2, que con el concurso de diferentes sintetasas como las prostaglandina E sintetasas (PGES), prostaciclina sintasa (PGIS) y tromboxano A sintasa (TXAS) producen prostanoideos con diferentes acciones en la pared vascular. COX-2 es un gen de respuesta temprana; su expresión depende de la actividad transcripcional del promotor y de la estabilización del mRNA a través de proteínas como HuR.

Objetivo: Evaluar si Ang II potencia las acciones inflamatorias inducidas por IL-1 β en la pared vascular a través de la producción de prostanoïdes de COX-2, los mecanismos implicados y el posible papel funcional de dichas acciones.

Métodos: Se utilizaron células musculares lisas de aorta de rata que se estimularon con Ang II y/o IL-1 β (4 o 24h). Los niveles de mRNA y proteína se analizaron por qPCR y "western blot", respectivamente. La proliferación se midió con un "kit" comercial y la migración por "wound healing" y "transwell". La actividad del promotor y de la región 3'UTR de COX-2 se midió por ensayos luciferasa, la translocación al citoplasma de HuR por inmunofluorescencia y fraccionamiento celular y la unión de HuR al mRNA de COX-2 por inmunoprecipitación. En el modelo de ligadura de carótida la expresión de COX-2, mPGES-1 y TXAS se realizó por inmunohistoquímica.

Resultados: 1) IL-1 β (10 ng/ml) incrementó la expresión de COX-2, mPGES-1 y TXAS. 2) Ang II (0,1 mM) aumentó la expresión de PGIS y TXAS y potenció y disminuyó, respectivamente, la expresión de COX-2 y de mPGES-1 inducida por IL-1 β . 3) La potenciación de la expresión de COX-2 se inhibió con un inhibidor de ERK1/2 y se acompañó de un aumento en la estabilidad del mRNA y de la actividad luciferasa de la 3'UTR; dicho aumento fue bloqueado por inhibidores de ERK1/2 y HuR. La combinación de Ang II+IL-1 β promovió la translocación al citoplasma y la unión de HuR al mRNA de COX-2. 4) Ang II potenció la migración pero no la proliferación celular inducida por IL-1 β , efecto que se bloqueó con inhibidores de COX-2, ERK1/2, HuR, TXAS y con antagonistas de los receptores TP, EP-1 y EP-3. 5) La adición exógena de PGE₂ y de un análogo de TXA₂ aumentaron la migración. 6) Tras la ligadura de carótida aumentó la expresión de COX-2, mPGES-1 y TXAS.

Conclusiones: 1) Ang II modula diferentemente la expresión vascular de COX-2, mPGES-1, PGIS y TXAS inducida por IL-1 β . 2) La potenciación de la expresión de COX-2 inducida por Ang II está mediada por ERK1/2 y se debe al aumento en la estabilidad del mRNA mediado por HuR. 3) TXA₂ y PGE₂ derivados de COX-2 participan en el efecto potenciador de Ang II sobre la migración celular inducida por IL-1 β . 4) Estos efectos podrían contribuir a las acciones proinflamatorias de Ang II en la pared vascular.

Subvencionado por MINECO (SAF2012-36400), ISCIII (RD12/0042/0024) FMM.

3. DIFERENTE REGULACIÓN DE NOX-1 Y NOX-4 POR INTERLEUQUINA-1 β Y ANGIOTENSINA II A NIVEL VASCULAR

A. Aguado Martínez¹, O. Zhenyukh¹, S. Martínez Revelles¹, T. Fischer², C. Rodríguez Sinovas³, J. Martínez González³, R. Aras López¹, D. Dixon⁴, A.M. Briones Alonso¹ y M. Salaices Sánchez¹

¹Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Hospital La Paz (IdiPAZ), Madrid. ²Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid. ³Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Barcelona. ⁴University of Kansas Medical Center, Kansas City.

Introducción: Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen un papel importante en la inflamación y el remodelado vascular a través de procesos de proliferación, migración y adhesión celular. La NADPH oxidasa (NOX) es la fuente principal de ROS en las arterias y estímulos como la angiotensina II (Ang II) e interleuquina 1 β (IL-1 β) pueden inducir su expresión. NOX está compuesta por distintas subunidades siendo NOX-1, NOX-4 y NOX-5 las principales en los vasos. Diferentes proteínas de unión a mRNA como HuR pueden participar en la estabilización del mRNA de NOX.

Objetivo: 1) Evaluar los efectos de la estimulación conjunta con Ang II e IL-1 β sobre la expresión de NOX-1 y NOX-4, la actividad NOX y la producción de ROS así como los mecanismos implicados y el papel funcional de ROS.

Métodos: Se utilizaron células musculares lisas de aorta de rata y de humano, que se estimularon con Ang II+ y/o IL-1 β (4 o 24h). Los niveles de mRNA se analizaron por qPCR. La actividad NOX se midió por la quimioluminiscencia producida por lucigenina y la producción de ROS por la fluorescencia producida por dihidroetidio. La translocación al citoplasma de HuR se realizó por inmunofluorescencia y fraccionamiento celular. La unión de HuR al mRNA de NOX-1 se midió por inmunoprecipitación de mRNA. La proliferación se midió con un "kit" comercial y la migración celular por "wound healing" y "transwell". La actividad del promotor y de la región 3'UTR se analizó con ensayos de actividad luciferasa.

Resultados: IL-1 β (10 ng/ml) incrementó la expresión de NOX-1, la actividad NOX y la producción de ROS, y disminuyó la expresión de NOX-4. Ang II (0,1 μ M) potenció la expresión NOX-1, la actividad de NOX y la producción de ROS inducida por IL-1 β y no modificó la disminución de NOX-4 promovida por IL-1 β . La potenciación de la expresión de NOX-1 inducida por Ang II se redujo con inhibidores de ERK1/2, de p38MAPK y de JNK, pero no de PI3K y se acompañó de un aumento en el mRNA que fue bloqueado por un inhibidor de HuR. La estimulación con Ang II+IL-1 β promovió la translocación al citoplasma y la unión de HuR al mRNA de NOX-1. La disminución de la expresión de NOX-4 inducida por IL-1 β se revirtió con los inhibidores de ERK1/2, JNK y PI3K y fue debida a una disminución de la actividad transcripcional. Ang II potenció la migración inducida por IL-1 β , pero no la proliferación, efecto que se bloqueó con un inhibidor de NOX-1.

Conclusiones: 1) Ang II potencia el incremento en la expresión vascular de NOX-1 inducida por IL-1 β por aumentar la estabilidad del mensajero mediado por HuR; sin embargo, Ang II no afecta a la disminución de la expresión de NOX-4 inducida por dicha citoquina. 2) Las ROS producidas por NOX-1 participan la migración celular inducida por Ang II+IL-1 β . 3) Estos efectos podrían contribuir a las acciones proinflamatorias de Ang II e IL-1 β en la pared vascular.

Subvencionado por el MINECO (SAF2012-36400), ISCIII (RD12/0042/0024), FMM y Fundación Mapfre.

4. PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL IR E IGF-1R EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

N. Beneit¹, L. Perdomo¹, O. Escribano¹, S. Díaz-Castroverde¹, N. de las Heras², M. Benito¹ y A. Gómez-Hernández¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, CIBERDEM, Madrid. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UCM, Madrid.

Objetivo: Una de las principales causas de mortalidad en los pacientes diabéticos es la enfermedad cardiovascular. Dichos pacientes muestran una aterosclerosis acelerada, caracterizada por un incremento de la proliferación, adhesión y migración de las células de músculo liso vascular (VSMCs). En este contexto, nosotros analizamos los efectos diferenciales de la insulina e IGFs en la migración de las VSMCs y la contribución de las isoformas del IR (IRA e IRB), IGF-1R así como los receptores híbridos (IRA:IGF-1R e IRB:IGF-1R).

Métodos: Se han generado nuevas líneas de VSMCs con IR e IGF-1R (IRLoxP^{+/+} VSMCs; IGF-1RLoxP^{+/+} VSMCs), sin IR (IR^{-/-} VSMCs) o IGF-1R (IGF-1R^{-/-} VSMCs) y que expresen sólo la IRA (IRA VSMCs) o IRB (IRB VSMCs). Se estudió la migración en todas las líneas de VSMCs

por ensayo de cierre de herida a las 6, 12 y 24h y se analizó la presencia de receptores híbridos por inmunoprecipitación con IRbeta y Western blot frente al IGF-1R.

Resultados: La insulina induce la migración de VSMCs a través del IR (principalmente a través de la isoforma IRA) y en menor medida a través del IGF-1R. Así, el mayor incremento se observó en IRLoxP^{+/+} e IRA VSMCs a las 12h y en IGF-1R^{-/-} VSMCs a las 24h de tratamiento con insulina, respectivamente. IGF-1 produjo aumentos significativos en la migración de todas las líneas celulares incluidas las IR^{-/-} VSMCs, excepto en las células IGF1R^{-/-} VSMCs. Sin embargo, IGF-2 indujo la migración a través de la IRA o de los receptores híbridos IRA:IGF-1R. Así, el máximo efecto inducido por IGF-2 fue en la migración celular observada en las IRA VSMCs a las 12 h, a través de los homodímeros IRA o formando receptores híbridos con el IGF-1R.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que la migración inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2 podría estar favorecida por el aumento de la expresión de IRA e IGF-1R como ocurre en las etapas tempranas del proceso aterosclerótico o en la aterosclerosis acelerada de pacientes diabéticos.

5. LA L-CARNITINA MODULA LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA NADPH OXIDASA A TRAVÉS DE LA PROTEÍNA QUINASA C Y EL SISTEMA NF-kB

A.J. Blanca Lobato¹, M.V. Ruiz Armenta¹, S. Zambrano Sevilla¹, J.L. Miguel Carrasco¹, F.M. González Roncero², E. Revilla Torres³, A. Mate Barrero¹ y C.M. Vázquez Cueto¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla. ²UGC Nefrología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla.

Objetivo: Es bien conocida la afectación de órganos diana como el corazón y el riñón en enfermedades cardiovasculares. En muchos casos las lesiones son consecuencia de un incremento de estrés oxidativo, existiendo un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) procedentes de la alta actividad de la enzima NADPH oxidasa. Dado que existen antecedentes sobre las propiedades antihipertensivas y antioxidantes de la L-carnitina (LC), el objetivo de este estudio es evaluar el efecto que ejerce la LC sobre la actividad/expresión de la NADPH oxidasa, la producción de peróxido de hidrógeno y los niveles de nitrotyrosina. Además, estudiamos el efecto de la LC sobre dos elementos claves en la activación y expresión de la NADPH oxidasa: la proteína quinasa C (PKC) y el sistema NF-kB.

Métodos: Para llevar a cabo este estudio, hemos utilizado la línea celular NRK-52E (células epiteliales del túbulos proximal). Las células fueron estimuladas con angiotensina II (Ang II), 10⁻⁷M, para favorecer la generación de un fenotipo hipertensivo caracterizado por un aumento de estrés oxidativo. La preincubación de las células con LC, en su caso, se llevó a cabo a una concentración de 10⁻³ M. La actividad NADPH oxidasa se determinó mediante luminometría, con el empleo de lucigenina. Los estudios de expresión génica y proteica se llevaron a cabo mediante técnicas de PCR a tiempo real y *Western blotting*, respectivamente. La actividad PKC se determinó utilizando un kit colorimétrico comercial.

Resultados: La incubación de las células NRK-52E con Ang II provocó un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno (O₂[•] y H₂O₂) y en los niveles de nitrotyrosina, efectos que fueron acompañados de modificaciones en la expresión de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa. La preincubación con LC provocó la normalización de todos estos parámetros. Por otro lado, los aumentos en la actividad PKC y en la activación del complejo NF-kB, ob-

servados tras la estimulación con Ang II, fueron revertidos hasta valores normales tras la preincubación con LC.

Conclusiones: L-carnitina reduce el estrés oxidativo inducido por la Ang II a través de su actuación sobre la enzima NADPH oxidasa, modulando su actividad y expresión mediante la regulación de la PKC y del sistema NF-kB.

Agradecimientos: Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta de Andalucía (PI-0060/2012). A. J. Blanca, M.V. Ruiz-Armenta y S. Zambrano son contratados del proyecto de investigación PI 0060/2012. Agradecemos a la Dra. Ana Fortuño su amabilidad por la cesión de las células usadas en el estudio.

6. LAS PROSTAGLANDINAS LIBERADAS POR EL TEJIDO ADIPOSO PERIVASCULAR PRESENTAN EFECTOS VASOACTIVOS SOBRE ARTERIAS DE RESISTENCIA EN RATAS SANAS Y OBESAS

E. Nava Hernández, S. Llorens Folgado, Y. Mendizábal Castillo y M.A. de la Cruz Morcillo

Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete.

Objetivo: Las prostaglandinas, sintetizadas en importantes cantidades por el endotelio vascular, constituyen uno de los factores más importantes en la regulación del tono vascular. En los últimos años se está prestando especial atención al tejido adiposo perivascular (PVAT), como un elemento que, junto con el endotelio vascular, contribuye con sus adiponectinas a la regulación vaso-motora. Se sabe desde hace años que los adipocitos liberan prostaglandinas en grandes cantidades. Pese a ello, no se ha descrito nunca el papel vasoactivo de las prostaglandinas de origen adipocitario. El objetivo de este trabajo es determinar si la grasa adventicial de arterias de resistencia expresa, sintetiza y libera PGE2, prostaciclina y TXA2 y caracterizar el posible papel vasoactivo sobre dichos vasos

Métodos: Se disecaron segmentos de arterias mesentéricas de resistencia procedentes de ratas control (WKY) y obesas (SHROB) de la siguiente forma: grupo A, arteria sin PVAT, eliminando todo el tejido adventicial (preparación tradicional); grupo B, arteria con PVAT, manteniendo una esfera de tejido adiposo perivascular alrededor del vaso; o grupo C, PVAT aislado, disecando exclusivamente la grasa perivascular y eliminando la arteria. La función endotelial se valoró en los grupos A y B por medio de miografía de Mulvany estimulando con acetilcolina (ACh). La expresión y actividad de ciclooxygenasa 2 (COX-2) se analizó en el grupo C. La liberación de metabolitos de prostaglandinas (PGEM, 6-keto-PGF_{1α} y TXB₂) se midió por ELISA en los grupos A y B tras estimulación con acetilcolina.

Resultados: El PVAT aislado del mesenterio mostró expresión y actividad de COX-2 en ambos grupos, similar entre tejidos de WKY y SHROB. El ELISA mostró la liberación de metabolitos de PGE₂, prostaciclina y TXA₂ tanto en arterias aisladas (grupo A), como en arterias con PVAT (grupo B). En el grupo A, los niveles de TXB₂ fueron mayores en SHROB que en WKY y, en general, la liberación de metabolitos cuantitativamente mayor en este grupo A que en el B. En éste último se detectó la liberación de todos los metabolitos de las prostaglandinas en niveles similares en WKY y SHROB. La miografía mostró que las arterias sin PVAT (grupo A) de SHROB, pero no las de WKY, relajan mucho mejor a ACh que las arterias con PVAT (grupo B). La inhibición de la actividad de la COX-2 (NS-398) mejoró notablemente la respuesta a ACh de las arterias con PVAT, especialmente en SHROB. El bloqueo de receptores de PGE2 (SC 19220) o prostaciclina (CAY 10441) ofreció resultados heterogéneos. El bloqueo de receptores de TXA₂ (SQ 29548) aumentó la respuesta a ACh de las arterias con PVAT de SHROB. Sin embargo, la inhibición de TXA₂ sintasa (furegrelato) no reprodujo este efecto.

Conclusiones: El tejido adiposo adventicial es una fuente, hasta ahora desconocida, de prostaglandinas con efecto vaso-motor. La presencia de este tejido está relacionada con la disfunción endotelial de las arterias de SHROB y la respuesta de éstas a las prostaglandinas del PVAT condiciona dicha disfunción.

7. ACTIVACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS 2 Y 9 EN PACIENTES HIPERTENSOS CON “ESCAPE” DE ALBUMINURIA

H. Pulido Olmo¹, C. Cerezo², J. Segura², C.F. García Prieto³, B. Somoza³, I. Aranguez¹, R. Kreutz⁴, L.M. Ruilope², G. Ruiz Hurtado² y M.S. Fernández Alfonso¹

¹Instituto Pluridisciplinar y Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid. ²Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación imas12, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

³Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación, Facultad de Farmacia, Universidad CEU-San Pablo, Madrid.

⁴Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Alemania.

Objetivo: Se ha descrito que existe un “escape” de albuminuria en pacientes hipertensos controlados con antihipertensivos inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona. El objetivo del estudio fue analizar en el plasma de estos pacientes la actividad de enzimas que degradan la matriz extracelular y que podrían favorecer este escape, como la metaloproteinasa 2 (MMP2) y MMP9, y correlacionarlas con el grado de albuminuria desarrollado. La comparación de la actividad de las MMPs en diferentes tejidos se realizó en el modelo de rata espontáneamente albuminúrica Munich Wistar Frömler (MWF).

Métodos: La actividad de las MMPs se determinó mediante zimografía en geles de poliacrilamida. Se utilizó el plasma de 17 pacientes hipertensos controlados normoalbuminúricos (albumina/creatinina ≤ 20 mg/g), y 20 pacientes albuminúricos, que se separaron en dos grupos: i) 13 pacientes microalbuminúricos (albumina/creatinina ≤ 200 mg/g) y ii) 7 pacientes macroalbuminúricos (albumina/creatinina >200 mg/g). El estudio de la actividad de las MMPs en el órgano diana de esta patología se realizó en riñones de ratas MWF de 12 semanas y se comparó con ratas normotensas y normoalbuminúricas Wistar Kyoto (WKY) (n = 6 por grupo). Además se estudió la correlación entre los valores obtenidos a nivel renal y sistémico en estas ratas.

Resultados: Los pacientes tanto micro- como macroalbuminúricos, mostraron un incremento significativo de la actividad enzimática de la MMP2 a nivel sistémico en comparación con los normoalbuminúricos (p < 0,001 para micro- y p < 0,05 para macroalbuminúricos), así como en la actividad de la MMP9 inducible (p < 0,01). Se observó una correlación positiva entre la actividad de ambas enzimas (r = 0,6200; p < 0,0001), así como la actividad de cada MMP y el grado de albuminuria que presentan los pacientes (r = 0,5285; p = 0,0008 para MMP9 y r = 0,4737; p = 0,0031 para MMP2). La actividad enzimática de MMP9 y MMP2 también fue significativamente mayor tanto en el riñón como en el plasma de las ratas MWF en comparación con las controles WKY (p < 0,001 para riñón y p < 0,05 para plasma). Además, en las ratas MWF hay una correlación directa entre la actividad de la MMP9 tisular y la sistémica.

Conclusiones: Este estudio demuestra que el escape de albuminuria de los pacientes hipertensos con presión arterial controlada se asocia significativamente con un aumento en la actividad plasmática de las enzimas MMP9 y MMP2. Esto podría estar relacionado con la mayor rigidez arterial que presentan estos pacientes. Los estudios en rata también mostraron un aumento en la actividad de

ambas MMPs en condiciones de albuminuria. La correlación entre la actividad sistémica y renal de la MMP9 en la rata apoya la idea de que la actividad de estas enzimas en plasma refleja lo que se observa a nivel tisular.

Agradecimientos: este trabajo se ha realizado gracias al Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-25303), Grupos UCM (GR921641), Deutsche Forschungs Gemeinschaft (DFG KR1152-3-1) y la Fundación Mutua Madrileña.

8. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO HIPOLIPEMIANTE DE UN EXTRACTO CON ALTO CONTENIDO EN POLIFENOLES OBTENIDO DE LA FIBRA INSOLUBLE DE ALGARROBA

B. Martín-Fernández¹, M. Valero-Muñoz¹, S. Ballesteros¹, L. Pérez-Olleros², B. Ruiz-Roso², V. Lahera¹ y N. de las Heras¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. ²Departamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

Objetivo: El objetivo de nuestro estudio fue evaluar los efectos potenciales de una fibra dietética insoluble obtenida de pulpa de algarroba (FIA) con alto contenido (> 80%) en polifenoles sobre el metabolismo hepático del colesterol (Col) y los triglicéridos (TG) en conejos con dislipemia mixta.

Métodos: Se utilizaron conejos New Zealand alimentados durante 8 semanas con dieta estándar (C: control) o experimental (DL: 0,5% colesterol y 14% aceite de coco). La mitad de animales DL fue tratado simultáneamente con FIA (1 g/Kg/día) (DL+FIA). Al final del tratamiento se determinaron los niveles séricos de colesterol total (Col-T), colesterol LDL (C-LDL) y colesterol HDL (C-HDL), y de TG. A nivel hepático se valoró la concentración de las principales enzimas implicadas en la síntesis y degradación de Col (HMG-CoA reductasa y 7 α -hidrolasa) y TG (glicerol 3 fosfato acil-transferasa, GPAT y lipasa), el grado de esteatosis hepática y la expresión proteica de los principales factores implicados en el metabolismo hepático de lípidos (SREBPs, proteínas de unión al elemento de respuesta a esteróles; receptores X; PPARs, receptores activados por proliferadores peroxisomales; SIRT1 y PGC-1 α , el coactivador 1 α del receptor activado por proliferadores peroxisomales de tipo γ).

Resultados: Los niveles plasmáticos de Col-T, C-LDL C-HDL y TG fueron mayores (p < 0,01) en los conejos DL que en los C. El tratamiento con FIA redujo todos los parámetros anteriores. La concentración proteica de HMG-CoA reductasa y 7 α -hidrolasa disminuyó (p < 0,05) en DL y aumento de forma significativa en DL+FIA. Asimismo, los animales DL tuvieron niveles elevados (p < 0,05) de GPAT y reducidos (p < 0,05) de lipasa. FIA disminuyó (p < 0,05) la expresión de GPAT y normalizó (p < 0,05) los niveles de lipasa. Los animales DL presentaron un elevado grado de esteatosis hepática y la fibra insoluble de algarroba no modificó. El grupo de animales DL presentó una expresión disminuida de PPAR α , PPAR γ , LXR y FXR, que el tratamiento no modificó. La expresión proteica de SREBP1c aumentó (p < 0,05) en DL y disminuyó (p < 0,05) en DL+FIA, mientras que la de SREBP2, SIRT1 y PGC-1 α disminuyó (p < 0,05) en DL y se normalizó (p < 0,05) con FIA.

Conclusiones: La administración de un extracto con alto contenido en polifenoles obtenido de la fibra insoluble de algarroba redujo la concentración sérica de Col mediante mecanismos relacionados con el aumento en la síntesis de sales biliares en hígado. Este hecho se relacionó además con modificaciones de la concentración proteica de la HMGCoA-Reductasa. Asimismo, la administración de FIA también disminuyó la concentración sérica de TG mediante la regulación de dos enzimas clave de su metabolismo,

GPAT y lipasa hepática. Los efectos hipolipemiantes observados parecen estar mediados por los factores SREBPs, SIRT1 o PGC-1 α .

9. DIFERENTE EXPRESIÓN PROTEICA EN LA LÍNEA CELULAR MEGACARIOBLÁSTICA MEG-01 DIFERENCIADA A PLAQUETA: IMPLICACIÓN DE LA ASPIRINA

J. Modrego Martín¹, P. Rodríguez Sierra¹, J.J. Zamorano León¹, N. de las Heras², V. Lahera Julia² y A. López Farre¹

¹Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Departamento de Fisiología, Universidad Complutense, Madrid.

Introducción: Los mecanismos potenciales propuestos para tratar de explicar la resistencia plaquetaria a la aspirina son muy diversos. Entre ellos, estudios previos han sugerido que el síndrome de resistencia plaquetaria a la aspirina podría influir en el tipo de plaqueta formada desde el megacariocito, generándose plaquetas menos respondedoras a la aspirina.

Objetivo: Analizar si la aspirina modifica el nivel de expresión de proteínas del citoesqueleto o proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, el metabolismo energético o la supervivencia celular en las plaquetas generadas de novo desde el megacariocito.

Métodos: A partir de la línea celular de megacarioblastos Meg-01, se añadió 10 nmol/L de forbol miristato acetato (PMA) durante 72 horas a 37 °C para inducir la maduración de megacarioblastos a megacariocitos y estimular la formación de plaquetas por parte de éstos, además de ser incubados en ausencia (CT; n = 6) o presencia (AAS; n = 6) de aspirina (0,33 mmol/L). Transcurridas las 72 horas, se recuperó las células en suspensión, se centrifugaron a 120 g durante 10 minutos quedando en el sobrenadante las plaquetas generadas de novo, y se realizó una segunda centrifugación a 700 g durante 10 minutos donde obtuvimos las plaquetas de novo precipitadas, a partir de las cuales se llevó a cabo el análisis proteómico.

Resultados: A) Proteínas del citoesqueleto: se analizaron 4 isoformas de β -tropomiosina, alfa tubulina, F-actin capping protein, 3 isoformas de la gelsolina y 4 isoformas de vinculina, donde únicamente se encontraron diferencias significativas en la β -tropomiosina isoforma 4 (CT: 12,48 ± 4,97 U.A; ASA: 30,50 ± 11,30 U.A, p = 0,047) y vinculina isoforma 2 (CT: 50,10 ± 7,85 U.A; ASA: 19,27 ± 4,18 U.A, p = 0,021). B) Proteínas relacionadas con el estrés oxidativo: se analizó la expresión de 6 isoformas de la cadena β del fibrinógeno, 3 isoformas de serotransferrina, alfa-1-antitripsina, 6 isoformas de la cadena γ del fibrinógeno, apo A1, Rho GDI, HSP 60, HSP 71, 3 isoformas de la catalasa, Protein disulfure isomerase y 5 isoformas de la cadena α del fibrinógeno. Se hallaron diferencias significativas en la cadena β del fibrinógeno isoforma 2, cadena β del fibrinógeno isoforma 4, alfa-1-antitripsina, apo A1 y cadena α del fibrinógeno isoforma3. C) Metabolismo energético: se analizaron 3 isoformas de la gliceralehido-3-fosfato deshidrogenasa, alfa enolasa, 2 isoformas de 58 Kda Glucose-regulated-protein, 3 isoformas piruvato quinasa, encontrándose solo diferencias significativas en la 58 Kda Glucose-regulated-protein isoforma 2 (CT: 14,39 ± 1,48 U.A; ASA: 36,02 ± 10,34, p = 0,019). D) Proteínas relacionadas con la supervivencia celular: canal nuclear de cloro, glutation-s-transferasa, calreticulina, calgranulina, y leukocyte enastase inhibitor, no encontrándose diferencias significativas en ninguna de ellas.

Conclusiones: La aspirina es capaz de aumentar la expresión de ciertas proteínas relacionadas con el citoesqueleto, el estrés oxidativo y el metabolismo energético de plaquetas generadas de novo a partir de la línea celular megacarioblástica Meg-01, lo cual implica que la aspirina no actúa simplemente sobre la plaqueta sino también en sus células precursoras.

10. PARICALCITOL DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR ALDOSTERONA Y TWEAK AL INHIBIR LA TRANSACTIVACIÓN DEL EGFR

J.L. Morgado Pascual¹, S. Rayego Mateos¹, C. Lavoz Barria¹, M. Alique Aguilar¹, A. Ortiz Arduán², J. Egido de los Ríos² y M. Ruiz Ortega¹

¹Laboratorio de Biología Celular en Enfermedades Renales, UAM, Madrid. ²División de Nefrología e Hipertensión, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid.

Introducción: La enfermedad renal crónica (ERC) se caracteriza por una pérdida progresiva de la función renal. La deficiencia de vitamina D y sus metabolitos activos es una característica patológica que ocurre temprano en la patogénesis de la ERC. En varios modelos experimentales de daño renal se ha observado que los análogos de la vitamina D atenúan el daño y reducen la inflamación, proceso clave en la evolución de ERC. El bloqueo de la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una nueva diana terapéutica en daño renal. La transactivación de EGFR está mediada por metaloproteasas de la familia ADAMs, que actúan liberando los ligandos inactivos unidos a membrana. En riñón se ha descrito que ADAM17 y los ligandos HB-EGF (EGF de unión a heparina) y TGF- α (factor de crecimiento transformante α) son los más relevantes. Nuestro objetivo es investigar si los efectos anti-inflamatorios de los análogos de la vitamina D están mediados por la transactivación del EGFR inducida por factores implicados en la progresión de daño renal, como son aldosterona o TWEAK.

Métodos: Los experimentos se efectuaron en células tubuloepiteliales renales humanas (línea celular HK2) y murinas (MCTs) analizando los resultados mediante distintas técnicas como Western blot y RT-PCR.

Resultados: La estimulación de células tubuloepiteliales con aldosterona o TWEAK induce la fosforilación de EGFR de forma dosis y tiempo dependiente. El bloqueo de ADAM-17, mediante inhibición farmacológica o silenciamiento genético, inhibió la fosforilación de EGFR causada por ambos factores. Sin embargo, el ligando liberado por cada factor es diferente. El pretratamiento con un anticuerpo neutralizante contra TGF- α , bloqueó la transactivación del EGFR inducida por ambos factores, mientras que la inhibición de HB-EGF (con CRM197; toxina neutralizante de la unión al EGFR) sólo disminuyó el efecto de TWEAK. El bloqueo farmacológico de EGFR, con el inhibidor de su quinasa, y de ADAM17, con TAPI-2, disminuyó la sobreexpresión de factores proinflamatorios (IL-6, MCP-1 y RANTES) inducidos por aldosterona y TWEAK. La estimulación con los ligandos recombinantes TGF- α y HB-EGF también aumentó la expresión génica de mediadores proinflamatorios. El pretratamiento con el análogo de la vitamina D paricalcitol inhibió la fosforilación de EGFR y la sobreexpresión de factores proinflamatorios inducidos por aldosterona y TWEAK, lo que sugiere que paricalcitol presenta efectos anti-inflamatorios al modular la ruta EGFR/ADAM17.

Conclusiones: En células tubulares la inhibición de la transactivación del EGFR por inhibidores de su quinasa, de ADAM17 y por paricalcitol disminuye la expresión de factores proinflamatorios inducidos por Aldosterona y TWEAK. Estos resultados muestran un nuevo mecanismo implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria renal.

11. ACCIONES ANTIOXIDANTES DE P144, UN PÉPTIDO DERIVADO DEL RECEPTOR TIPO III DEL TGF- β 1

A. Pejenaute Martínez de Lizarrondo¹, J.L. Miguel Carrasco², J. Dotor de las Herreras³, G. San José Enériz², M.U. Moreno Zulategui², G. Zalba Goñi¹ y A. Fortuño Gil²

¹Departamento de Bioquímica y Genética, Universidad de Navarra, Pamplona. ²Área de Ciencias Cardiovasculares, Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. ³DIGNA Biotech, Madrid.

Objetivo: P144 es un péptido sintético de 14 aminoácidos (TSLDA-SIIWAMMQN) cuya secuencia procede del receptor humano tipo III del TGF β . P144 inhibe la producción de anión superóxido (O_2^-) mediada por la NADPH oxidasa en el tejido renal y cardíaco de la rata espontáneamente hipertensa (SHR). El objetivo del presente estudio fue analizar si P144 ejerce acciones antioxidantes intrínsecas, independientes de los efectos derivados del bloqueo de TGF-b₁.

Métodos: La producción de O_2^- se valoró por quimoluminiscencia. El efecto antioxidante del P144 se estudió en las líneas celulares HEK293, NRK52E y Raw264.7, así como en homogenizados proteicos de corteza renal de rata. Además, se analizó su efecto sobre la reacción enzimática de la Xantina-Xantina oxidasa y sobre la producción química de O_2^- generada por KO_2 .

Resultados: (1) P144 reduce la señal generada por el O_2^- en condiciones basales o tras estimulación con un éster de forbol (PMA) en la línea celular NRK52E; (2) P144 reduce la señal generada por el O_2^- en homogenizados proteicos de corteza renal de ratas o de las líneas celulares HEK293, NRK52E y Raw264.7; (3) P144 reduce la señal generada por el O_2^- mediada por la xantina oxidasa; (4) P144 reduce la señal generada por el O_2^- obtenido mediante la reacción química del KO_2 ; (5) el efecto antioxidante ejercido a nivel celular, proteico y químico era específico de la secuencia de P144, ya que otros péptidos modificados levemente (mediante cambio en el orden de los aminoácidos, por mutaciones puntuales de algunos aminoácidos aromáticos, o por la adición extra de algún aminoácido) perdían esta capacidad antioxidante intrínseca.

Conclusiones: P144 es un péptido con acciones pleiotrópicas, capaz de prevenir las alteraciones funcionales y estructurales de los órganos diana de la hipertensión arterial. Con independencia de las acciones mediadas por el bloqueo de TGF-b₁, el presente estudio demuestra que este péptido posee propiedades antioxidantes intrínsecas, que probablemente deben desempeñar un papel relevante en el pleiotropismo de esta sustancia reduciendo la afectación orgánica asociada a la hipertensión arterial.

12. EL SULFURO DE HIDRÓGENO MEJORA LA FUNCIÓN RENAL EN UN MODELO DE DAÑO TISULAR CAUSADO POR UNA ISQUEMIA REPERFUSIÓN

C. Pérez Pardo, F.J. Fenoy Palacios, I. Hernández García, M. García Salom, F. Rodríguez Mulero y B. López Cano

Universidad de Murcia, Murcia.

Objetivo: El sulfuro de hidrógeno (H_2S) ha sido clasificado recientemente como un miembro de la familia de los transmisores gaseosos. En su síntesis biológica están implicadas principalmente las enzimas cistationina β -sintasa (CBS) y cistationina γ -liasa (CSE) que generan H_2S a partir del aminoácido L-cisteína (L-cys). Estudios previos realizados recientemente ponen de manifiesto los efectos protectores del H_2S en el daño renal producido tras una isquemia-reperfusión (IRI), una de las causas principales de la insuficiencia funcional aguda producida tras un trasplante renal. El objetivo de este estudio fue determinar los niveles corticales renales de H_2S durante una IRI, así como evaluar el papel del H_2S en la función renal 24 horas después de la isquemia-reperfusión renal.

Métodos: A ratas Sprague-Dawley anestesiadas se las sometió a una isquemia/reperfusión caliente de 45/60 minutos de duración, durante la infusión intrarrenal de solución salina (IRI, n = 8), NaHS 80 nmol/Kg/min (IRI + H₂S, n = 6), L-cys 80 μ mol/Kg/min (IRI + L-cys, n = 4) o propargilglicina 2 μ mol/Kg/min (PPG, un inhibidor de la CSE) + ácido amino-oxiacético 0,5 μ mol/Kg/min [(AOAA, un inhibidor de la CBS), IRI + Inh, n = 5]. La concentración cortical renal de H_2S se midió electroquímicamente; además, se evaluaron también el flujo sanguíneo renal (FSR) y la tasa de filtración glomerular (TFG). En otro grupo de ratas se determinó la TFG 24 horas después de una isquemia renal de 45 minutos de duración. A estos animales se les administró previamente vía i.v. (en mg/Kg) salino (IRI, n = 6), 1 NaHS (IRI + H₂S, n = 10), 50 L-Cys (IRI + L-cys, n = 8), o 40 PPG + 3 AOAA (IRI + Inh, n = 5).

Resultados: La isquemia renal provocó un aumento de los niveles corticales de H_2S que disminuyeron a valores pre-isquémicos durante la reperfusión. El aumento de H_2S fue aminorado significativamente en el grupo de IRI + Inh. La infusión de NaHS, L-Cys o PPG+AOAA no modificó los valores basales de FSR y TFG. El donante de H_2S , la L-Cys o PPG+AOAA no tuvieron efectos sobre la TFG (1.154,6 \pm 177,1 μ l/min/g) en los riñones no isquemizados. 24 horas después de la isquemia, la TFG disminuyó en los riñones isquemizados, IRI (226,7 \pm 75,8) y en las ratas IRI+ Inh (153,2 \pm 67,1). La disminución en la TFG mejoró significativamente en riñones isquemizados de ratas pretratadas con NaHS (579,8 \pm 131,1) y L-Cys (698,2 \pm 155,3).

Conclusiones: La isquemia renal produce un aumento significativo en los niveles corticales renales de H_2S endógenos, pero solo un pretratamiento con una fuente de H_2S exógena contribuye a la mejora significativa de la insuficiencia renal aguda observada 24 horas después de la reperfusión.

13. LA SITAGLIPTINA REDUCE LA ASIMILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN FAVOR DE GLUCOSA EN EL CORAZÓN DIABÉTICO EXPERIMENTAL

E. Ramírez Bustillo¹, M. Klett Mingo¹, B. Picatoste Botija¹, A. Caro Vadillo², J. Tuñón Fernández¹ y O. Lorenzo González¹

¹IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid.

²Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.

Objetivo: Estudiar el efecto de la sitagliptina en la asimilación de glucosa y ácidos grasos en el miocardio de ratas diabéticas tipo-II.

Antecedentes: En situaciones de daño cardíaco el corazón utiliza glucosa como fuente energética principal. Sin embargo, en diabetes el corazón utilizará ácidos grasos como único substrato disponible. La sitagliptina mejora la hiperglicemia y resistencia a insulina, pero se desconoce si pudiera influir en los transportadores celulares para glucosa y ácidos grasos.

Métodos: Ratas diabéticas tipo-II (Goto-Kakizaki; GK) y wistar recibieron sitagliptina (10 mg/kg/día) o vehículo durante 20 semanas. Posteriormente se midieron las dimensiones y función cardíaca por eco-Doppler, y se evaluó la asimilación de glucosa por tomografía por emisión de positrones (PET). Los corazones fueron aislados y procesados para obtener sus extractos de proteína y RNA total. En los plasmas se midieron además determinados parámetros metabólicos.

Resultados: Las ratas GK desarrollaron hiperglicemia y disfunción diastólica [aumento temprano de la velocidad de llenado ventricular (ratio E/A) y disminución del diámetro del ventrículo izquierdo]. Además, el miocardio GK redujo la asimilación de glucosa principalmente en las regiones basales y medias del corazón, y la expresión/translocación de Glut4 (transportador de glucosa), en favor de FAT/CD36 (transportador de ácidos grasos). Interesantemente, el tratamiento con sitagliptina atenuó estos eventos.

Conclusiones: La sitagliptina podría mejorar la función cardiaca del corazón diabético a través del incremento de la asimilación de glucosa y reducción de ácidos grasos, y de sus respectivos receptores celulares.

14. MODULACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE LAS CMLV HUMANAS POR VITRONECTINA: ESTUDIOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

I. Martí Pàmies, O. Calvayrac, B. Ferrán, S. Aguiló, C. Rodríguez y J. Martínez González

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), Instituto de Investigación Biomédica (IIB-Sant Pau), Barcelona.

Objetivo: La vitronectina (VTN) es un glicoproteína presente en plasma, matriz extracelular y en los gránulos de las plaquetas, que entre otros efectos, contribuye a la hemostasia a través de la regulación de la coagulación sanguínea y la fibrinólisis y promueve adhesión y spreading celular. En este estudio se analiza el papel de la VTN sintetizada por las células musculares lisas vasculares (CMLV) como factor quimiotáctico paracíntico y la regulación de su expresión a nivel transcripcional.

Métodos: Se utilizaron CMLV humanas de aorta. Estas células fueron transducidas con lentivirus para expresar factores de transcripción. La migración celular se analizó mediante Transwells™, y la expresión de VTN mediante PCR a tiempo real, *Western blot*, inmunoquímica y ELISA. El promotor del gen humano de la VTN se clonó en un vector reportero (pGL3VTN-1.7), y se analizó la actividad transcripcional mediante transfección transitoria. La interacción DNA-proteína se examinó mediante EMSA y ChIP.

Resultados: En CMLV transducidas con varios factores de transcripción aumentó la expresión y secreción de VTN. Los sobrenadantes procedentes de estas células incrementaron la migración de CMLV, efecto que fue bloqueado por anticuerpos anti-VTN. El análisis *in silico* del promotor de la VTN (1,7 Kbp) permitió localizar varios elementos putativos de respuesta a factores de transcripción en la región proximal. Mediante transfecciones transitorias con pGL3VTN-1.7 y vectores de expresión de dichos factores de transcripción, combinadas con análisis de delecciones y mutagénesis dirigida, se identificaron elementos de respuesta funcionales cuya implicación se confirmó mediante ensayos de interacción proteína-DNA.

Conclusiones: La región proximal del promotor de la VTN posee una gran capacidad reguladora de la actividad transcripcional, que conduce a un aumento de la expresión y secreción de VTN con capacidad paracíntica para inducir la migración de las CMLV.

15. LA CIAP2 REGULA EL EQUILIBRIO SUPERVIVENCIA/APOPTOSIS EN LAS CMLV: CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS EN CIS IMPLICADOS

J. Alonso, M. Galán, S. Aguiló, C. Rodríguez y J. Martínez González

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), Instituto de Investigación Biomédica (IIB-Sant Pau), Barcelona.

Objetivo: La inestabilidad de las placas de ateroma se ve favorecida por una cubierta fibrosa débil y un elevado contenido lipídico y de células inflamatorias. La apoptosis de las células musculares lisas (CMLV) contribuye a debilitar dicha cubierta y aumenta la inestabilidad. La clAP2 podría participar en el balance apoptosis/supervivencia de las células vasculares. En este estudio se analiza la regulación de clAP2 en células vasculares y su papel en apoptosis.

Métodos: Se utilizaron células musculares lisas vasculares (CMLV) humanas y células endoteliales (HUVEC). Las células se transducieron con lentivirus para expresar factores de transcripción o se ex-

pusieron a hipoxia. El nivel de expresión de clAP2 se analizó mediante PCR, Western blot e inmunocitoquímica. El promotor de clAP2 se clonó en un vector reportero (pGL3clAP2-1.8) y se analizó la actividad transcripcional mediante transfección transitoria. La interacción DNA-proteína se examinó mediante EMSA y ChIP. Se determinó la actividad caspasa. La expresión de clAP2 se inhibió mediante siRNA.

Resultados: La hipoxia indujo la expresión de clAP2 con un máximo a las 4 h. La actinomicina D bloqueó esta inducción, lo que sugirió la implicación de un mecanismo transcripcional. El análisis *in silico* del promotor de la clAP2 (1,8 Kbp) permitió localizar varios elementos putativos de respuesta a factores de transcripción en la región proximal. Mediante transfecciones transitorias con pGL3clAP2-1.8 y vectores de expresión de dichos factores de transcripción, combinadas con análisis de delecciones y mutagénesis dirigida, se identificaron elementos de respuesta funcionales cuya implicación se confirmó mediante ensayos de interacción proteína-DNA. El bloqueo de clAP2 moduló la actividad caspasa de las células.

Conclusiones: La región proximal del promotor de la clAP2 posee una gran capacidad reguladora de la actividad transcripcional, y la expresión de clAP2 previno la apoptosis en células vasculares.

16. IDENTIFICACIÓN DE UNA HUELLA MOLECULAR EN ORINA QUE RESPONDE A ALBUMINURIA Y SU EVOLUCIÓN EN PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON BLOQUEANTES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

L. González Calero¹, M. Martín Lorenzo¹, M. Posada Ayala¹, M. Baldán Martín², F. de la Cuesta Marina², J. Segura de la Morena³, M.G. Barberas², L.M. Ruilope⁴, G. Álvarez Llamas¹ y F. Vivanco Martínez¹

¹IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. ²Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM, Toledo. ³Hospital 12 de Octubre, Madrid.

⁴IIS-Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Introducción: El efecto beneficioso del bloqueo del sistema renina-angiotsina-aldosterona (SRAA) es claro, sin embargo parece que pudiera existir cierta resistencia en algunos pacientes tal que no se llega a impedir un progreso de la enfermedad. La microalbúminuria es uno de los predictores de dicha evolución y se observa con alta prevalencia que los pacientes en tratamiento crónico presentan albuminuria, e incluso pueden desarrollar microalbúminuria de novo. Sin embargo, no existen marcadores capaces de predecir la evolución clínica de los pacientes.

Objetivo: El objetivo de este estudio es descubrir una huella molecular en orina asociada a la evolución de la albuminuria en pacientes hipertensos crónicamente tratados, tal que permita evaluar la respuesta terapéutica a la acción de los inhibidores de SRAA (i-SRAA).

Métodos: Mediante estrategias ómicas, se han investigado cambios en el proteoma y metaboloma de la orina. Se tomaron muestras de orina de controles sanos y pacientes hipertensos en supervisión crónica del SRAA. Los pacientes se clasificaron en tres grupos: normoalbúminicos que se mantuvieron como tal (normo-normo), normoalbúminicos que progresaron a microalbúminuria (normo-micro) y microalbúminicos que se mantuvieron estables en esa condición (micro-micro).

Resultados: Mediante análisis diferencial en gel (DIGE) y espectrometría de masas, se identificaron 27 manchas proteicas significativamente alteradas (ratio > 2; p < 0,05) correspondientes a 11 proteínas que respondían a la condición de albuminuria con distinta tendencia. Dos proteínas se encontraron alteradas en pacientes frente a controles, tres proteínas respondían específicamente a la condición de microalbúminuria y seis proteínas se encontraron significativamente variadas en alguno de los tres grupos, normo-normo, normo-micro o micro-micro. Por resonancia magnética nuclear

(RMN), se identificaron 26 señales de metabolitos alteradas en respuesta a la condición de albuminuria con tres tendencias observadas: respondedores a la progresión, respondedores a la condición de hipertensión, y respondedores a estado intermedios de evolución (normo-normo o normo-micro) y que no se muestran variados respecto a controles o sujetos micro-micro.

Conclusiones: Hemos identificado una huella molecular específica de proteínas y metabolitos de la orina que responde a la condición de albuminuria y su evolución, en pacientes hipertensos tratados con i-SRAA.

17. EFECTOS DIFERENCIALES DEL TNF-ALFA Y LA INSULINA EN LA MODULACIÓN DE UCP-2 Y SU PAPEL EN EL DAÑO VASCULAR

A. Gómez-Hernández¹, L. Perdomo¹, N. de las Heras², N. Beneit¹, O. Escribano¹, C. Guillén¹, S. Díaz-Castroverde¹, V. Cachofeiro², V. Lahera² y M. Benito¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, CIBERDEM, Madrid. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UCM, Madrid.

Objetivo: Se ha descrito que el aumento de la expresión de UCP-2 en la vasculatura podría prevenir el desarrollo de aterosclerosis en pacientes diabéticos, obesos o hipertensos que tienen mayor producción de especies reactivas de oxígeno. Así, un mayor conocimiento en la modulación de UCP-2 podría mejorar el manejo del proceso aterosclerótico. Sin embargo, el efecto del TNF-alfa o la insulina en la modulación de UCP-2 en células vasculares o en la pared vascular es completamente desconocido. En este contexto, nos planteamos estudiar nuevos mecanismos que ayuden a explicar si la moderada hiperinsulinemia o la reducción de los niveles de TNF- α podrían ayudar a tener un papel protector frente al daño vascular mediado por la modulación de UCP-2.

Métodos: Se analizó el efecto de la insulina o el ácido oleico en presencia o no de TNF-alfa en la expresión de UCP-2 en células endoteliales (ECs) o en células de músculo liso vascular (VSMCs). A continuación, quisimos estudiar si algunos de los mecanismos estudiados *in vitro* podrían tener alguna relevancia *in vivo*. Para ello se utilizaron los siguientes modelos experimentales: ratón ApoE^{-/-} a las 8, 12, 18 y 24 semanas de edad, el ratón BATIRKO sometido a una dieta rica en grasas durante 16 semanas y el ratón BATIRKO de 52 semanas de edad con/sin tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-TNF-alfa.

Resultados: En primer lugar, se encontró que el tratamiento con TNF-alfa no sólo indujo resistencia a la insulina sino además redujo la expresión de UCP-2 inducida por insulina tanto en ECs como en VSMCs. En segundo lugar, se observó una progresiva reducción de los niveles de UCP-2 junto con un aumento de la acumulación lipídica y del área de lesión en la aorta de ratones ApoE^{-/-}. Además, se ha observado también que el ratón BATIRKO obeso con hiperinsulinemia moderada tenía niveles menores de TNF-alfa y ROS y aumentados los niveles de UCP-2 en la aorta, menor acumulación lipídica, disfunción vascular y daño macrovascular. En el tercer modelo, observamos que el tratamiento con anti-TNF-alfa redujo la disminución de los niveles de UCP-2 así como una mejora en las alteraciones vasculares observadas en BATIRKO de 52 semanas de edad. Así, al igual que *in vitro*, en los distintos modelos experimentales se ha observado una correlación positiva y significativa entre los niveles de insulina circulantes y los niveles de UCP-2 en la aorta y una correlación inversa y significativa entre los niveles de expresión de TNF-alfa e iNOS con UCP-2 en la aorta.

Conclusiones: Nuestros datos sugieren que la insulina y el TNF-alfa tienen efectos opuestos en la modulación de UCP-2 tanto en células vasculares *in vitro* como en la aorta de los distintos modelos *in vivo*. Además, una moderada hiperinsulinemia frente a la

resistencia a la insulina o la reducción de los niveles de TNF-alfa en la aorta podrían atenuar el daño vascular a través del aumento de los niveles de UCP-2 en la aorta mediado en parte por la reducción de iNOS.

18. EFECTOS DE UN ACEITE DE ORUJO CONCENTRADO EN ÁCIDOS TRITERPÉNICOS SOBRE LAS ALTERACIONES VASCULARES ASOCIADAS A LA HIPERTENSIÓN EN RATAS

S. Ballesteros¹, M. Valero-Muñoz¹, B. Martín-Fernández¹, J.C. Quintela², V. Lahera¹ y N. de las Heras¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. ²Natac Biotech, S.L., Parque Científico de Madrid, Campus de Cantoblanco, Madrid.

Objetivo: El objetivo del presente trabajo fue analizar los potenciales efectos de un aceite de orujo concentrado en ácidos triterpénicos (AOCT) sobre las alteraciones funcionales y moleculares asociadas a la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Métodos: Se utilizaron SHR macho de 22 semanas de edad divididas en dos grupos: SHR, utilizadas como control, y SHR+AOCT, tratadas durante 8 semanas con un aceite de orujo concentrado en ácidos triterpénicos (5% v/v). Se midió la presión arterial (PA) al inicio y a las 4 y 8 semanas de evolución. Al final del experimento se valoró la función endotelial en aorta (relajación dosis-dependiente en respuesta a la acetilcolina), y la expresión proteica de eNOS, TGF β , colágeno I y TNF α en la aorta.

Resultados: El tratamiento con el aceite de orujo concentrado en ácidos triterpénicos previno ($p < 0,05$) el aumento de la PA a lo largo de todo el periodo de evolución. Los animales tratados con AOCT presentaron un aumento ($p < 0,05$) de la relajación a la acetilcolina con respecto a los no tratados, indicando una mejora de la función endotelial. Este efecto se acompañó de un aumento ($p < 0,05$) de la expresión aórtica de eNOS en el grupo SHR+AOCT. Además, el tratamiento con AOCT disminuyó ($p < 0,05$) la expresión en la aorta de TNF α , TGF β y colágeno I en el grupo SHR+AOCT en comparación con el grupo SHR.

Conclusiones: El tratamiento con el aceite de orujo concentrado en ácidos triterpénicos frena el desarrollo de la hipertensión en las SHR. Este efecto se asocia con una mejora de la función endotelial y una reducción de la inflamación y de la fibrosis vascular.

19. IMPORTANCIA DEL REMODELADO VASCULAR EN EL DESARROLLO DE INSUFICIENCIA CARDIACA EN EL SÍNDROME METABÓLICO EN RATA

N. López Andrés¹, I. Falcao-Pires², A. Lourenco², A. Leite-Moreira², F. Zannad³ y P. Rossignol³

¹Navarrabiomed, Fundación Miguel Servet, Pamplona.

²Department of Physiology and Cardiothoracic Surgery, University of Porto, Portugal. ³UMRS_1116, Nancy, France.

Introducción: La obesidad, la hipertensión, la dislipidemia y la resistencia a la insulina son alteraciones propias del síndrome metabólico (SM), y aumentan el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca (IC). En este estudio queremos investigar la contribución del remodelado vascular a la IC en un modelo de rata con SM.

Métodos y resultados: Se utilizaron cuatro grupos de ratas (Wistar Kyoto, n = 11; ZSF1 control, n = 11; ZSF1 obesas, n = 11 y ZSF1 obesas con dieta rica en grasa, n = 11). Durante 20 semanas, se realizaron evaluaciones metabólicas, ecocardiográficas y hemodinámicas. La morfología y la composición de la aorta se determinaron después del sacrificio mediante bioquímica, histología y análisis moleculares. A las 20 semanas de edad, el grupo ZSF1 control presentó hipertensión, mientras que los dos grupos de ZSF1 obesas

presentaron hipertensión y diabetes. En las ZSF1 control el remodelado vascular era evidente sólo a nivel molecular; sin embargo, los grupos ZSF1 obesas mostraron alteraciones en la morfología y composición de la aorta. Las ratas obesas presentaron además un aumento del espesor de la media aórtica y de la fibrosis vascular, caracterizado por un incremento del colágeno de tipo I, el colágeno de tipo III, la fibronectina, la actividad metaloproteína y una disminución de los niveles de elastina. Asimismo, las ratas obesas exhibieron un aumento en la expresión vascular de las proteínas de unión a la matriz extracelular (integrinas). Por último, en los animales obesos los niveles aórticos de marcadores profibróticos (cadiotrofina-1, galectina-3, TGF- β y CTGF) estaban igualmente aumentados.

Conclusiones: A las 20 semanas de edad las ratas ZSF1 obesas desarrollan un remodelado vascular que contribuiría de forma importante a la evolución hacia IC. La dieta rica en grasa empeora de forma modesta el remodelado vascular en los animales ZSF1 obesos.

20. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL COLESTEROL HDL Y SU RELACIÓN CON EL RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

A. Ortega Hernández¹, V. Estrada¹, S. Serrano Villar², M. Ávila¹, M. Heras³, L. Masana³, A. Fernández-Cruz¹ y D. Gómez Garre¹

¹Hospital Clínico San Carlos-IdISSC, Madrid. ²Hospital Ramón y Cajal-IRYCIS, Madrid. ³Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus.

Introducción: El papel ateroprotector del colesterol HDL (c-HDL) se ha atribuido a su implicación en el trasporte reverso de colesterol y, en los últimos años, también a otras funciones como su capacidad anti-oxidante, anti-inflamatoria y anti-trombótica. Esta diversidad de funciones se ha asociado a su heterogeneidad, tanto en su composición como tamaño de las partículas. La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se caracteriza por una disminución en los niveles de c-HDL que persisten bajos aún después del tratamiento antirretroviral, por lo que se ha sugerido que el c-HDL podría ser una importante diana terapéutica en el tratamiento de la enfermedad CV de estos pacientes.

Objetivo: Estudiar la funcionalidad del c-HDL de pacientes con VIH, así como su relación con el grosor íntima-media carotídeo (GIM-c), utilizado como marcador de aterosclerosis subclínica.

Métodos: Hemos estudiado 100 pacientes con VIH (42 ± 10 años, 77% varones, 74% en tratamiento antirretroviral). Las HDL se aislaron por ultracentrifugación. Su actividad anti-inflamatoria se evaluó por su habilidad para inhibir la quimiotaxis de monocitos inducida con MCP-1 y la anti-oxidante valorando su capacidad para inhibir la oxidación de la LDL *in vitro* [generación de malondialdehído (MDA)]. La composición proteica del c-HDL se analizó mediante ELISAs comerciales. El GIM-c se midió por ultrasonido. Se consideraron pacientes con HDL disfuncional a aquellos que presentaban una tasa de quimiotaxis u oxidación de la LDL superior a la mediana.

Resultados: En comparación con las HDL aisladas de sujetos control sin infección, las HDL de los pacientes con VIH presentaron una peor capacidad anti-inflamatoria (52 ± 3 vs 70 ± 5% células migradas, $p < 0,05$) y anti-oxidante (2,9 ± 0,9 vs 11,6 ± 2,0 nmol MDA/mg c-HDL, $p < 0,05$). Sesenta y cinco pacientes cumplían presentaron HDL disfuncional. No se encontraron diferencias significativas en la edad, la presión arterial o el perfil lipídico, incluyendo los niveles de HDL (50 ± 13 vs 51 ± 13 mg/dL), en la carga viral o el número de linfocitos CD4+ entre los pacientes con y sin HDL disfuncional. Sin embargo, los pacientes con HDL disfuncional presentaban un mayor GIM-c que los pacientes con HDL funcional (0,56 ± 0,06 vs 0,52 ± 0,04 mm, $p < 0,05$). Respecto a la composición de las partículas, las HDL clasificadas como disfuncionales tenían significativamente me-

nos cantidad de apo A-I (14 ± 1 vs 20 ± 1 mg/mg c-HDL) y lecitín-colesterol-acetil transferasa (LCAT) (3,7 ± 0,3 vs 11,6 ± 2,0 mg/mg c-HDL), y más de proteínas proinflamatorias como el serum amiloida (23,7 ± 4,9 vs 32,9 ± 0,7 mg/mg c-HDL). Importante, un 67,7% de los pacientes con HDL disfuncional estaban en tratamiento.

Conclusiones: Los pacientes con VIH muestran una alteración de la función anti-inflamatoria y anti-oxidante de la HDL que se asocia con un mayor GIM-c. El tratamiento antirretroviral normaliza los valores virológicos e inmunológicos pero no restituye la funcionalidad de las HDL. Es posible que estudiar la función de las HDL de los pacientes VIH pueda ayudar a establecer de forma más precisa su riesgo cardiovascular.

21. GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES DE ATROSCLEROSIS USANDO NUEVOS VECTORES VÍRICOS

M. Roche Molina, D. Sanz-Rosa, B. Ibáñez y J.A. Bernal Rodríguez

Laboratorio de Modelos de Enfermedades Cardiovasculares e Imagen en Cardiología Experimental, CNIC, Madrid.

La hipercolesterolemia y los problemas asociados a la aterosclerosis se desarrollan a través de una multitud de complejas redes e interacciones genéticas y medioambientales. Múltiples complicaciones cardiovasculares que se derivan de la degeneración progresiva del sistema vascular se espera que siga siendo la principal causa de mortalidad en el mundo. Modelos animales de aterosclerosis han ayudado en gran medida a entender la enfermedad y a desarrollar estrategias para su tratamiento. Por ejemplo gracias a estos estudios en animales se descubrió que la “proprotein subtilisin/kexin” tipo 9 (PCSK9) reduce la capacidad hepática de captar partículas lipídicas de baja densidad (LDL) reduciendo la cantidad de receptores de LDL (LDLR) en la membrana celular. Esto podría sugerir tratamientos alternativos a pacientes que no responden a medicación basada en estatinas para bajar los niveles de colesterol en sangre, que ponen en riesgo la vida del paciente. Ratones deficientes en esta proteína mantienen bajos niveles de colesterol LDL y tienen un riesgo de evento cardiovascular por debajo de la media, esto contrasta con animales que presentan mutaciones asociadas a ganancia de función en PCSK9 que presentan hipercolesterolemia y predisposición a desarrollar aterosclerosis. Este es un nuevo campo de trabajo que necesita del desarrollo de modelos adicionales de estudio que ayuden a establecer y caracterizar terapias basadas en la inhibición de la función de PCSK9 y su relación con la variabilidad del fondo genético. Aquí presentamos como utilizando metodologías usadas en terapia génica somos capaces de generar modelos de enfermedad a partir de colonias de animales silvestres, independientemente del fondo genético. Hemos generado de una manera eficiente y reproducible modelos de hiperlipidemia y aterosclerosis en los que se puede valorar la contribución al riesgo cardiovascular mediado por la proteína PCSK9.

22. DIFERENCIAS EN LAS NECESIDADES ENERGÉTICAS ENTRE EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO Y MARRÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL

J. Modrego Martín¹, P. Rodríguez Sierra¹, M. Valero Muñoz², N. de las Heras², Z. López Ibarra¹, A. González Cantalapiedra³, J.J. Zamorano León¹, V. Lahera Julia² y A. López Farre¹

¹Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

³Departamento de Cirugía, Hospital Universitario ROF Codina, Lugo.

Introducción: Los mamíferos poseen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón (TAM) y el tejido adiposo blanco (TAB), los

cuales tienen diferentes funciones fisiológicas y pueden ser diferenciados tanto por su apariencia como por sus características metabólicas. La principal función fisiológica del TAM es la generación de calor en pequeños mamíferos y neonatos humanos, el principal mecanismo para evitar la hipotermia. El TAB es principalmente un tejido de reserva energética aunque es bien conocido que también es capaz de liberar diferentes moléculas implicadas en la regulación de la ingesta de alimento y de la homeostasis energética.

Objetivo: Analizar las diferencias en enzimas y metabolitos relacionados con las principales rutas de generación de energía en TAM y TAB de conejos New Zealand.

Métodos: De cada animal se obtuvo (n = 10; 3,5 kg) una biopsia subcutánea de TAM (zona interescapular) y de TAB (zona lumbar). Se analizó, mediante proteómica y Western blot, la expresión de enzimas claves en distintas rutas del metabolismo energético celular: α -enolasa, fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa (glucólisis aeróbica), malato deshidrogenasa (ciclo de Krebs), carnitina palmitoil transferasa I (CPTI-I) y acil CoA deshidrogenasa (transporte y oxidación de ácidos grasos). Se midieron diferentes actividades enzimáticas: lactato deshidrogenasa (glucólisis anaeróbica), aconitasa y malato deshidrogenasa (ciclo de Krebs), además del contenido total de lactato en ambos tipos de tejido adiposo.

Resultados: Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de tres de las enzimas relacionadas con la glucólisis aeróbica en TAM respecto a TAB (fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, α -enolasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) y una disminución significativa en la expresión de la piruvato deshidrogenasa en TAM al compararlo con TAB, así como un incremento en el contenido total de lactato en TAM. La actividad lactato deshidrogenasa no se vio modificada en ninguno de los dos tejidos adiposos. Respecto al ciclo de Krebs, tanto la expresión como la actividad de la malato deshidrogenasa estaban disminuidas significativamente en TAM respecto a TAB, mientras que la actividad aconitasa no estaba alterada. En cuanto al transporte de ácidos grasos al interior mitocondrial, CPTI-I aumentó significativamente en TAM respecto al TAB, y la expresión de acil CoA, enzima implicada en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, aumentó significativamente en el TAM respecto al TAB.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que el TAM es capaz de utilizar vías alternativas para la generación de energía, tales como la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, que podrían retroalimentar la ruta de la glucólisis para finalmente acabar siendo un metabolismo de generación de energía anaerobio cuyo fin último fuera la formación de lactato. Este proceso metabólico podría ser utilizado por parte del organismo como mecanismo de generación de calor en situaciones de frío intenso.

23. EL DAÑO RENAL ASOCIADO A HIPERLIPIDEMIA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE KLOTHO EN RATONES KNOCKOUT PARA APOE

C. Sastre Reyero¹, A. Rubio Navarro¹, I. Buendía Montes¹, C. Gómez Guerrero¹, J. Blanco², J. Egido de los Ríos¹, S. Mas Fontao¹, L.M. Blanco Colio¹, A. Ortiz Arduán¹ y J.A. Moreno Gutiérrez¹

¹Laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular, IIS-Fundación Jiménez Diaz, Madrid. ²Departamento de Patología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Introducción: Klotho es una proteína secretada por el riñón con funciones protectoras sobre endotelio vascular ya que incrementa la producción de óxido nítrico, previene la disfunción endotelial y reduce la presión arterial. La expresión de Klotho disminuye en patología cardiovascular y renal, aunque los mecanismos implicados en este descenso no son conocidos. Puesto que el aumento de

los lípidos plasmáticos está involucrado en el desarrollo de estas patologías, evaluamos si la hiperlipidemia podría modular la expresión de Klotho.

Métodos: 32 ratones C57BL/6 y 32 ratones apoE -/- fueron alimentados con una dieta hiperlipídica o con una dieta estándar por 5 o 10 semanas. Realizamos experimentos en células tubulo-epiteliales murinas proximales (MCT) y distales (NP-1) para estudiar el efecto de LDL oxidadas (LDL-ox) sobre la expresión de Klotho.

Resultados: El consumo de una dieta hiperlipídica aumentó de manera significativa los niveles séricos y renales de colesterol, la severidad de las lesiones renales, la expresión de citoquinas proinflamatorias (RANTES y MCP-1), el infiltrado de macrófagos y el estrés oxidativo (anión superóxido) en los ratones apoE -/- . Además, observamos una reducción significativa en los niveles de ARNm y proteína de Klotho en los riñones de los ratones apoE -/- alimentados con una dieta hiperlipídica. Para estudiar los mecanismos implicados en la disminución renal de Klotho incubamos células tubulo-epiteliales murinas con LDL-ox. Las células tubulares MCT y NP-1 fueron capaces de captar LDL-ox, lo que incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la expresión y secreción de RANTES, MCP-1 y TNF- α , así como una disminución de Klotho tanto a nivel de ARNm como de proteína. Por último, la inhibición de NF- κ B y ERK revirtió el descenso de Klotho inducido por las LDL-ox.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que el daño renal asociado a hiperlipidemia reduce la expresión de Klotho, lo que podría explicar la disminución de esta proteína en pacientes con enfermedad vascular y renal.

24. INVESTIGACIÓN MOLECULAR EN ANAFILAXIA VASCULAR “RIMVA”

V. Esteban¹, B.M. Jensen¹, L.F. Larsen¹, S. Falkencrone², J.M. Redondo³, L. Klitfod⁴, P.S. Skov², L.H. Garvey⁵ y L.K. Poulsen¹

¹Allergic Clinic; ²Department of Vascular Surgery; ³Department of Anaesthesiology, Gentofte University Hospital, Copenhagen, Dinamarca. ²Reflab ApS, Copenhagen, Dinamarca. ³Department of Vascular Biology and Inflammation, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid.

Objetivo: Anafilaxia es considerado el síndrome más severo de las enfermedades alérgicas y se ha descrito como una reacción con aparición repentina y que puede causar la muerte. Muchos órganos están implicados en anafilaxia pero de gran interés es el fenómeno de permeabilidad vascular y caída de presión arterial que acontece. Se cree que las reacciones alérgicas son la principal causa de anafilaxia, pero también otros mecanismos no inmunológicos podrían tener un papel fundamental. Moléculas liberadas desde el sistema nervioso simpático que proporciona una rica inervación a los vasos cutáneos también son de interés en este estudio. En este contexto, el proyecto “RIMVA” sugiere un estudio molecular exhaustivo de la interacción inmune-vascular (mastocitos y basófilos con células endoteliales (EC) y células de musculatura lisa (CMLV)) que acontece en anafilaxia. Estudios previos han demostrado como la proteína reguladora de calcineurina 1 (RCAN1) está implicada en el remodelado de la pared vascular, considerándose interesante su estudio en el contexto descrito.

Métodos: Nuestro estudio abarca gran variedad de cultivos celulares primarios de EC y CMLV de humano y ratón. El material humano usado es vena safena (procedente de pacientes sometidos a cirugía) o bien vasculatura inserta en la dermis e hipodermis (procedente de pacientes sometidos a abdominoplastias). Los cultivos celulares de ratón usados se obtienen de vasos de diferentes órganos (pulmón, aorta, etc.). El estudio comparativo de las interacciones entre los mediadores anafilácticos liberados por las célu-

las efectoras (mastocitos y basófilos) sobre la pared vascular, nos permitirá conocer los protagonistas de los procesos que acontecen en anafilaxia-vascular. Ensayos funcionales de permeabilidad, ensayos moleculares y el uso de modelos animales en ratón nos ayudara a entender los mecanismos subyacentes.

Resultados: Ensayos preliminares realizados en EC y CMLV de macro- y micro-vasculatura muestran diferencias en permeabilidad vascular dependiendo de la naturaleza del estímulo alergénico al que los vasos están expuestos. Histamina, como principal mediador liberado por las células efectoras, así como el neuropéptido CGRP afectan a la expresión de RCAN1 en células vasculares de humano y ratón. Estudios de permeabilidad subcutánea *in vivo* en ratones deficientes en RCAN1, muestran una mayor permeabilidad en respuesta a Histamina que ratones de fenotipo salvaje. Además, la infección de células vasculares con construcciones lentivirales que modifican la expresión de RCAN1 está siendo una herramienta fundamental para comprobar si esta proteína participa en la evolución de la reacción anafiláctica en células humanas.

Conclusiones: Tanto la barrera endotelial como la capa de musculatura lisa juegan un papel particularmente importante en la regulación del flujo sanguíneo, por eso ensayos moleculares que reproducen situaciones *in vitro* de anafilaxia son importantes. Esto podría ser fundamental en el descubrimiento de prometedoras dianas para una futura prevención terapéutica así como en intervención.

25. EXISTE UN PERFIL PROTEÓMICO Y METABOLÓMICO EN SANGRE DE PACIENTES HIPERTENSOS CON VALOR PRONÓSTICO DE LA EFICIENCIA DE LA SUPRESIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

M. Baldán Martín¹, F. de la Cuesta¹, L. Mourino Álvarez¹, G. Álvarez Llamas², L. González Calero², J. Segura³, L.R. Padial⁴, F. Vivanco², L.M. Ruilope⁵ y M.G. Barderas¹

¹Laboratorio de Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Parapléjicos (HNP), SESCAM, Toledo. ²Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. ³Unidad de Hipertensión, Hospital 12 de Octubre, Madrid. ⁴Departamento de Cardiología, Hospital Virgen de la Salud, Toledo. ⁵Departamento de Riesgo Cardiovascular e Hipertensión, IIS-Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Objetivo: La albuminuria se define como una excreción de albúmina en orina por encima de los niveles normales, a consecuencia de un daño renal, en pacientes con hipertensión arterial (HTA), y es un potente predictor de eventos cardiovasculares y renales. La supresión del sistema renina-angiotensina (SRA) está asociado con una albuminuria prolongada o desarrollada *de novo*. El objetivo del presente estudio fue la búsqueda de un perfil proteómico y metabolómico en sangre de pacientes en ambas situaciones, en comparación con un grupo control de pacientes hipertensos con bloqueo del SRA.

Métodos: En este estudio, se han analizado proteínas y metabolitos en plasma, y el contenido proteico de micropartículas circulantes, en pacientes con albuminuria, prolongada o desarrollada *de novo*, frente a pacientes normoalbuminúricos con HTA, con el fin de identificar biomarcadores con valor pronóstico. Para el análisis proteómico de las muestras de plasma sanguíneo, se deplecionaron las 14 proteínas mayoritarias y se analizaron por electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE), y marcaje isobárico iTRAQ por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). El análisis metabolómico fue realizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS). Por otro lado, el contenido proteico de la micropartículas circulantes de estos pacientes fue analizado mediante LC-MS/MS.

Resultados: El análisis proteómico y metabolómico del plasma de estos pacientes ha permitido definir un grupo de proteínas y metabolitos diferencialmente expresados, que nos han permitido

clasificar a los pacientes con albuminuria prolongada, albuminuria *de novo* y normoalbuminúricos.

Conclusiones: El estudio realizado ha permitido definir un perfil proteómico y metabolómico asociado con el desarrollo de albuminuria que puede ser de gran utilidad en el seguimiento de pacientes con HTA.

26. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA INTERLEUQUINA-33/ST-2 EN LOS EFECTOS DE LA ALDOSTERONA EN ADIPOCITOS

E. Martínez-Martínez¹, V. Cachofeiro², E. Rousseau³, M. Miana², R. Jurado-López², F. Zannad³, P. Rossignol³ y N. López-Andrés¹

¹NavarraBiomed (Fundación Miguel Servet), Pamplona.

²Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Madrid. ³INSERM, Centre d'Investigations Cliniques-9501, UMR 1116, Université de Lorraine and CHU, Nancy, Francia.

Objetivos: La interleuquina-33 (IL-33) y su isoforma transmembrana (ST2L) ejercen efectos protectores en el corazón, mientras que la forma soluble circulante de ST2 (sST2) es un biomarcador pronóstico en pacientes con insuficiencia cardiaca. La aldosterona (Aldo) y el sST2 están aumentados en la obesidad mórbida, aunque las posibles interacciones entre los dos sistemas no han sido analizadas. El objetivo del estudio fue valorar el papel del sistema IL33/ST2 en el tejido adiposo, así como su interacción con la Aldo en la función adipocitaria. Asimismo, se evaluó si sST2 podría ser una nueva diana terapéutica para reducir el remodelado del tejido adiposo asociado a la obesidad.

Métodos y resultados: Ratas Wistar alimentadas con dieta grasa durante 6 semanas presentaron un aumento en el tejido adiposo de IL-33 y sST2 así como un incremento en los marcadores de diferenciación, fibrosis e inflamación. Los niveles de sST2 en tejido adiposo se asociaron positivamente con los niveles plasmáticos de Aldo. En la línea celular adipocitaria 3T3-L1, el tratamiento con IL-33 o con ST2L retrasó la diferenciación, disminuyó la acumulación lipídica, redujo los niveles de leptina y resistina y redujo la expresión de marcadores proinflamatorios y profibróticos. El tratamiento con sST2 aumentó de forma específica el colágeno tipo 6 en los adipocitos 3T3-L1. La Aldo disminuyó la expresión de IL-33 y aumentó la de sST2 vía su receptor mineralocorticoide. Los procesos de diferenciación, inflamación y fibrosis inducidos por la Aldo fueron bloqueados por la administración de IL-33 o de ST2L en adipocitos.

Conclusiones: sST2 está sobre-expresado en la obesidad, mientras que la actividad del sistema protector IL-33/ST2L está deprimida. IL-33 y ST2L inhiben la adipogénesis, la inflamación y la fibrosis, mientras que sST2 induce la síntesis de colágeno en tejido adiposo. La Aldo disminuye la expresión del sistema protector de la IL-33 y aumenta la expresión de la forma deletérea sST2 en adipocitos. Además, IL-33 y ST2L bloquean los efectos deletéreos de la Aldo en adipocitos, sugiriendo que IL-33 y ST-2L pueden ser dianas terapéuticas potenciales que regulen la respuesta de la Aldo en el tejido adiposo.

27. PAPEL DE TOLL LIKE RECEPTOR-4 EN EL INCREMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EXPRESIÓN VASCULAR DE CICLOOXYGENASA-2 EN HIPERTENSIÓN

R. Palacios Ramírez¹, P. Rossi de Batista¹, A. Martín Cortés¹, R. Hernanz Martín¹, S. Martínez Revelles², A. Aguado Martínez², L. García Redondo², M. Salaices Sánchez² y M.J. Alonso Gordo¹

¹Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón. ²Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Introducción: El aumento en la actividad del sistema renina-angiotensina parece contribuir al estrés oxidativo vascular y a la

expresión de marcadores de inflamación como ciclooxigenasa-2 (COX-2) observados en hipertensión. Entre los mecanismos implicados en los efectos pro-inflamatorios de angiotensina II (AngII), la activación de la vía de señalización de toll like receptor (TLR)-4 podría tener un importante papel. Numerosas evidencias indican que TLR-4 es capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de activar factores de transcripción proinflamatorios como NF-κB, el cual está implicado en la activación de la expresión de COX-2. La vía de señalización de TLR-4 contribuye al desarrollo de diversas patologías cardiovasculares y, puesto que puede mediar algunos efectos producidos por AngII, podría contribuir también al establecimiento de la hipertensión y a las alteraciones vasculares que en ella se producen.

Objetivo: Analizar si el aumento de la actividad del sistema renina-angiotensina descrito en hipertensión contribuye al aumento de COX-2 y ROS observados en esta patología por mecanismos dependientes de la vía de señalización de TLR-4.

Métodos: Se utilizaron segmentos de aorta de ratas normotensas (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR), tratadas o no con el antagonista de receptores AT₁, losartán (15 mg/Kg/día, 12 semanas en el agua de bebida) y de aorta de ratones control o infundidos con AngII (1,44 mg/Kg/día, 2 semanas, s.c.) tratados con un anticuerpo anti-TLR-4 o con un anticuerpo control (1 µg/día, i.p.). Asimismo se utilizaron células de músculo liso de aorta (CMLV) de ratas SHR y WKY. Los niveles de ARNm se determinaron por qRT-PCR, la actividad NADPH oxidasa (NOX) por la quimioluminiscencia producida por lucigenina y los niveles de anión superóxido por análisis de fluorescencia con dihidroetido y microscopía confocal.

Resultados: Los niveles de ARNm de TLR-4 fueron mayores tanto en aorta como en CMLV de ratas SHR que en WKY; el tratamiento de SHR con losartán redujo dichos niveles. Asimismo, la infusión de AngII a ratones aumentó la expresión de TLR-4 en aorta; el tratamiento de ratones infundidos con AngII con anti-TLR-4 redujo la presión arterial. En CMLV de SHR, AngII (0,1 µM) también incrementó la expresión de TLR-4. Además, AngII aumentó la actividad de la NOX, la producción de anión superóxido y la expresión de COX-2; todos estos parámetros fueron reducidos por el antagonista de TLR-4 CLI-095 (1 mM). Tanto el inhibidor de la NOX Apocinina (30 µM), como el inhibidor de la subunidad catalítica NOX-1 ML171 (0,5 mM), redujeron la expresión de COX-2 inducida por AngII.

Conclusiones: El aumento de TLR-4 inducido por AngII participa en el desarrollo de hipertensión, así como en la producción de ROS y en la expresión de COX-2 originados por este factor humorral. Experimentos adicionales son necesarios para confirmar si TLR-4 participa también en las alteraciones en la función y estructura vascular que se observan en hipertensión.

Subvencionado por el MINECO (SAF2012-36400), ISCIII (RD12/0042/0024) y la URJC (PRIN13_CS12).

28. PAPEL DE LA LEPTINA EN LAS ALTERACIONES VASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD

M. Miana¹, E. Martínez-Martínez¹, R. Jurado¹, M.V. Bartolomé², A.M. Briones³, N. López⁴ y V. Cachofeiro¹

¹Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Madrid. ²Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Psicología, Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología, Madrid. ³Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología, Madrid. ⁴NavarraBiomed, Fundación Miguel Servet, Pamplona.

Objetivo: Valorar la posible implicación de la leptina en el remodelado vascular asociado a la obesidad con especial interés en la producción de componentes de matriz extracelular.

Métodos: Se evaluaron los componentes de matriz extracelular (MEX) y los niveles de O₂^{·-} en la aorta de ratas macho Wistar alimentadas

durante 6 semanas con una dieta con alto contenido en grasa (33.5%), o una dieta estándar (CT; 3,5%). Asimismo se observaron los efectos de leptina (100 ng/ml) sobre los componentes de la MEX y la producción de anión superóxido (O₂^{·-}) en presencia o ausencia del antioxidante melatonina (10⁻³ mmol/L) y del inhibidor de la vía PI3K/Akt, el LY294002 (2 × 10⁻⁴ mmol/L) en células de músculo liso vascular (CMLV) procedentes de rata adulta.

Resultados: La dieta con alto contenido en grasa produjo un incremento en el peso corporal (26%; p < 0,01) con respecto a los animales CT. Los animales obesos mostraron niveles elevados (p < 0,05) tanto de leptina circulante como vascular, colágeno total, colágeno tipo I, fibronectina, TGF-β, CTGF, fosforilación de Akt y O₂^{·-} con respecto a los animales CT. Los niveles de leptina aórticos se correlacionaron con los niveles de colágeno total, colágeno tipo I, TGF-β y CTGF. La leptina incrementó los niveles (p < 0,05) de colágeno tipo I, fibronectina, TGF-β, CTGF, O₂^{·-} y la fosforilación de Akt en CMLV. La presencia tanto de melatonina como de LY294002 previno (p < 0,05) estos cambios a excepción de la producción de O₂^{·-}, en el caso del inhibidor de la vía PI3K/Akt.

Conclusiones: La obesidad se asocia con un aumento de matriz extracelular lo que sugiere una mayor rigidez de la aorta. En este remodelado vascular parece participar la leptina mediante la producción de componentes de la MEX en CMLV a través de la activación de estrés oxidativo-vía PI3K/Akt y la producción de factores profibróticos como TGF-β y CTGF.

29. “ESCAPE” DE ALBUMINURIA Y ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES HIPERTENSOS BAJO BLOQUEO CRÓNICO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

G. Ruiz Hurtado¹, L. Condezo Hoyos², H. Pulido Olmo³, I. Aranguez⁴, M.C. González², S. Arribas², C. Cerezo¹, J. Segura¹, M. Fernández Alfonso³ y L.M. Ruilope¹

¹Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UAM, Madrid. ³Instituto Pluridisciplinar y Facultad de Farmacia, UCM, Madrid. ⁴Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid.

Objetivo: La albuminuria se considera un marcador temprano de daño en el eje cardiovasculo-renal con un fuerte valor predictivo en la aparición de futuras complicaciones cardiovasculares y renales en los pacientes hipertensos, diabéticos y en la población general. Recientemente se ha descrito un “escape” de albuminuria también conocido como albuminuria “de novo” no controlado en pacientes hipertensos bajo bloqueo crónico del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) a pesar del buen control de los valores de presión arterial. El objetivo de este estudio fue analizar si este escape de albuminuria podría estar relacionado con un aumento del estrés oxidativo en estos pacientes.

Métodos: Utilizamos muestras plasmáticas de pacientes normoalbuminúricos (n = 21) y albuminúricos (n = 20) en estadio 2 de desarrollo de enfermedad crónica renal recogidas en la Unidad de Hipertensión del Hospital 12 de Octubre de Madrid. En estas muestras se analizaron diferentes marcadores de daño oxidativo, como el contenido total de carbonilos y de malondialdehído (MDA). Por otro lado, se determinaron diferentes marcadores de la defensa antioxidante tanto enzimática (actividad de superóxido dismutasa y de catalasa), como de la defensa antioxidante no enzimática dependiente de los antioxidantes de bajo peso molecular (contenido de glutatión, de grupos tioles, de ácido úrico y de bilirrubina). Además, se analizó la capacidad antioxidante total denominada TAC (*total antioxidant capacity*) de cada muestra.

Resultados: Los pacientes albuminúricos presentaron un mayor daño oxidativo reflejado por el incremento significativo del contenido en carbonilos (p < 0,001) y en MDA (p < 0,05). Este daño oxida-

tivo vino acompañado por un aumento significativo de la actividad de la catalasa ($p < 0,05$) y de los antioxidantes de bajo peso molecular pero sólo cuando éstos fueron medidos como TAC ($p < 0,01$), sin encontrarse diferencias significativas cuando ellos fueron medidos individualmente. Con el objetivo de establecer un estatus oxidativo en estos pacientes se definieron nuevos índices globales de daño oxidativo y defensa antioxidant utilizando una aproximación matemática y estadística con los resultados obtenidos de cada parámetro analizado. Los índices establecidos para daño oxidativo y defensa antioxidant se encontraron incrementados significativamente, pero solamente el índice pro-oxidante tenía una correlación directa y positiva con el incremento en el escape de albuminuria de los pacientes ($r = 0,4907$; $p < 0,0024$).

Conclusiones: Estos resultados establecen una relación directa entre la aparición de una albuminuria “*de novo*” no controlada y el incremento del daño oxidativo en un grupo de pacientes hipertensos con presión arterial controlada con terapia anti-hipertensiva con inhibidores del RAAS.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado gracias al ISCIII (FIS PI/02432), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-25303) y la Fundación Mutua Madrileña.